

Aus dem Institut für Virologie der Universität Zürich
(Direktor : Prof. Dr. R. Wyler)

**Nachweis virusbedingter Atemwegserkrankungen beim Rind
im Winter 1986/87.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Christine Läuchli
Tierärztin
von Remigen (AG)

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. Dr. U. Braun, Korreferent

Zürich 1988

Rieker + Partner AG, Glattbrugg



Aus dem Institut für Virologie der Universität Zürich
(Direktor : Prof. Dr. R. Wyler)

**Nachweis virusbedingter Atemwegserkrankungen beim Rind
im Winter 1986/87.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Christine Läuchli
Tierärztin
von Remigen (AG)

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. Dr. U. Braun, Korreferent

Zürich 1988

Rieker + Partner AG, Glattbrugg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507222_0024

KONKRETISIERUNGS

1. DIALOGFRAGEN

Meinen Eltern gewidmet

1.1. WIE VIEL VERSTÄNDNIS HAST DU FÜR...

2. BEWERTUNG UND BEWERTUNG

- 2.1. ...
- 2.2. ...
- 2.3. ...
- 2.4. ...
- 2.5. ...
- 2.6. ...
- 2.7. ...
- 2.8. ...
- 2.9. ...
- 2.10. ...
- 2.11. ...
- 2.12. ...
- 2.13. ...
- 2.14. ...
- 2.15. ...
- 2.16. ...
- 2.17. ...
- 2.18. ...
- 2.19. ...
- 2.20. ...
- 2.21. ...
- 2.22. ...
- 2.23. ...
- 2.24. ...
- 2.25. ...
- 2.26. ...
- 2.27. ...
- 2.28. ...
- 2.29. ...
- 2.30. ...
- 2.31. ...
- 2.32. ...
- 2.33. ...
- 2.34. ...
- 2.35. ...
- 2.36. ...
- 2.37. ...
- 2.38. ...
- 2.39. ...
- 2.40. ...
- 2.41. ...
- 2.42. ...
- 2.43. ...
- 2.44. ...
- 2.45. ...
- 2.46. ...
- 2.47. ...
- 2.48. ...
- 2.49. ...
- 2.50. ...
- 2.51. ...
- 2.52. ...
- 2.53. ...
- 2.54. ...
- 2.55. ...
- 2.56. ...
- 2.57. ...
- 2.58. ...
- 2.59. ...
- 2.60. ...
- 2.61. ...
- 2.62. ...
- 2.63. ...
- 2.64. ...
- 2.65. ...
- 2.66. ...
- 2.67. ...
- 2.68. ...
- 2.69. ...
- 2.70. ...
- 2.71. ...
- 2.72. ...
- 2.73. ...
- 2.74. ...
- 2.75. ...
- 2.76. ...
- 2.77. ...
- 2.78. ...
- 2.79. ...
- 2.80. ...
- 2.81. ...
- 2.82. ...
- 2.83. ...
- 2.84. ...
- 2.85. ...
- 2.86. ...
- 2.87. ...
- 2.88. ...
- 2.89. ...
- 2.90. ...
- 2.91. ...
- 2.92. ...
- 2.93. ...
- 2.94. ...
- 2.95. ...
- 2.96. ...
- 2.97. ...
- 2.98. ...
- 2.99. ...
- 2.100. ...

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1.1. Liste der verwendeten Abkürzungen

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Untersuchungsmaterial

2.2. Immunprophylaktische Massnahmen in den Betrieben

2.3. Nasentupferproben

2.4. Serumgewinnung

2.5. Viren

2.6. Zellen und Virusvermehrung

2.7. Medien

2.8. Antigenpräparation

2.8.1. Präparation des bovinen respiratorischen Synzytialvirus- und des Parainfluenzavirus Typ3-Antigens

2.8.2. Präparation des bovinen Coronavirus-Antigens

2.8.3. Präparation des bovinen Adenovirus Typ1- und Typ4-Antigens

2.8.3.1. BAV-1-Vermehrung

2.8.3.2. BAV-4-Vermehrung

2.8.3.3. BAV-1- und BAV-4-Antigenreinigung

2.9. Durchführung des ELISA zum Antikörpernachweis

2.9.1. Nachweis von Antikörpern gegen das BCoV

2.9.2. Nachweis von Antikörpern gegen das BAV-1 und BAV-4

2.9.3. Nachweis von Antikörpern gegen das BVDV

2.10. Herstellung der Antiseren für den Virusantigennachweis in Nasentupferproben mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF)

- 2.10.1. Herstellung von Antiseren gegen das BRSV (M-Mc-A-BRSV) und gegen das PI-3 (R-A-PI-3)
- 2.10.2. Herstellung von Kaninchenantiserum gegen das BCV (R-A-BCV)
- 2.10.3. Herstellung von Kaninchenantisera gegen das BAV-1 und das BAV-4 (R-A-BAV-1 und R-A-BAV-4)
- 2.11. Virusantigennachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF)**
 - 2.11.1. IIF allgemein
 - 2.11.2. IIF speziell
- 2.12. Nachweis einer Virusinfektion

3. RESULTATE

- 3.1. Die Diagnose von BRSV-, PI-3-, BCV-, BAV-1- und BAV-4-Infektionen mittels Antigen- (direkt) und Antikörpernachweis (indirekt)**
 - 3.1.1. Ergebnisse bei den Einzeltieren
 - 3.1.2. Virusinfektionen in den 45 Betrieben, aus denen die Einzeltiere stammten
 - 3.1.3. Immunitätslage der Tiere bei der ersten Untersuchung
- 3.2. Übereinstimmung der Ergebnisse bei direktem und indirektem Virusnachweis**
 - 3.2.1. Vergleich der Ergebnisse der direkten und indirekten Nachweismethode bei der Untersuchung von Einzeltieren
 - 3.2.2. Vergleich der Ergebnisse der direkten und indirekten Nachweismethode bezogen auf die Betriebe
- 3.3. Ergebnisse der serologischen Untersuchung auf BVD-Virus**
- 3.4. Infektionen mit einem oder mehreren Viren (Einzel- und Mehrfachinfektionen)**
- 3.5. Das Auftreten von viralen Atemwegserkrankungen beim Rind in den Wintermonaten 1986/1987**
 - 3.5.1. Häufigkeit der Meldungen von Fällen respiratorischer Erkrankungen in den Betrieben während der Monate Oktober 86 bis April 87
 - 3.5.2. Häufung von Virusinfektionen in der Zeit von Oktober 86 bis April 87

3.6. Betriebe, in denen bei den erkrankten Tieren keine Virusinfektion nachzuweisen war

3.7. Geimpfte Betriebe

4. DISKUSSION

4.1. Vor- und Nachteile der angewandten Testmethoden

4.1.1. IIF und ELISA: Vor- und Nachteile

4.1.2. Übereinstimmung der Ergebnisse der zwei Nachweisverfahren (Antigennachweis, respektive Nachweis des Antikörpertiteranstieges)

4.2. Diskussion der Resultate

4.2.1. Der Nachweis von Virusinfektionen bei Tieren mit Atemtrakterkrankungen

4.2.1.1. Infektion mit dem bovinen respiratorischen Synzytialvirus (BRSV)

4.2.1.2. Infektion mit dem Parainfluenzavirus Typ 3 (PI-3) Virus

4.2.1.3. Infektion mit dem bovinen Coronavirus (BCV)

4.2.1.4. Infektionen mit den bovinen Adenoviren Typ 1 und Typ 4 (BAV-1, BAV-4)

4.2.1.5. Infektion mit dem Virus der bovinen Virusdiarrhoe (BVDV)

4.2.2. Abfall des Antikörpertiters

4.2.3. Fälle, bei denen keine Virusinfektion nachweisbar war

4.2.4. Vergleich der Diagnostik am Einzeltier mit der Bestandesdiagnostik

4.3. Andere Erreger, die aetiologisch beim "Bovine Respiratory Disease Complex" in Frage kommen

4.3.1. Viren

4.3.2. Bakterien

4.3.3. Mykoplasmen und Chlamydien

4.4. Therapie, Prophylaxe und Impfungen

4.4.1. Therapie

4.4.2. Prophylaxe

4.4.2.1. Die Verabfolgung von Einstellfutter

4.4.2.2. Immunprophylaxe

4.4.3. Impfungen

5. ZUSAMMENFASSUNG

6. LITERATURVERZEICHNIS

7. VERDANKUNGEN

8. LEBENS LAUF

1. EINLEITUNG

Mit dem englischen Begriff "**Bovine Respiratory Disease Complex (BRDC)**" auch "Rindergrippe" genannt, wird eine weitverbreitete multifaktorielle Respirationstrakterkrankung der Rindergattung bezeichnet. Sie tritt besonders im Winterhalbjahr auf und ist durch plötzliches Fieber, Nasenausfluss, Dyspnoe, Husten und allgemeine Apathie gekennzeichnet. Selten ist der Tod eines Tieres bei einem perakuten Verlauf zu beobachten. Betroffen sind vorwiegend Rinder in Mastbetrieben, wo eine grosse Zahl von Tieren eines bestimmten Alters mit einem ungenügenden Immunschutz schädigenden Umweltfaktoren ausgesetzt sind. Aber auch jüngere Tiere in Milch- und Aufzuchtbetrieben (7,35,47,52,59) und seltener Kühe können erkranken. Verluste entstehen dem Tierhalter infolge akuter Todesfälle, infolge Gewichtsverlust der Tiere und Milchrückgang, sowie infolge Ausmerzens von Kümmerern. Zusätzlich hat der Besitzer die daraus entstandenen Behandlungskosten zu tragen. (4,51,52,59). Die aetiologische Bedeutung der Viren beim BRDC ist unbestritten (7,19,27,32, 33,36,38,51,53,59).

Dem **bovinen respiratorischen Synzytialvirus (BRSV)** wird in zahlreichen Ländern eine wichtige Rolle bei respiratorischen Erkrankungen des Rindes zugeschrieben (6,27,57), was auch für die Schweiz gilt (17,18,19,32). Das BRSV wurde deshalb in unsere Untersuchung miteinbezogen. Dadurch ergab sich zudem die Möglichkeit, die Häufigkeit von BRSV-Infektionen während zwei aufeinanderfolgenden Wintern in einem nahezu identischen Praxisgebiet zu vergleichen (19).

Im Gegensatz zum BRSV ist die pathogene Bedeutung des **Parainfluenzavirus Typ3 (PI-3)**, trotz Isolierung bei erkrankten Tieren (7,36,38,40,53,58), umstritten. Es soll ihm eine Rolle als Wegbereiter für bakterielle Sekundärinfektionen (38,40) und für andere Viren zukommen (18).

Das **bovine Coronavirus (BCV)** ist als Durchfallerreger beim Kalb bekannt. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass in Analogie zu anderen Coronaviren (TGE beim Schwein, FIP bei der Katze, Infektiöse Bronchitis beim Huhn, Atemwegserkrankungen beim Menschen) auch BCV pneumotrop sein

kann (41,42,55).

Die **bovinen Adenoviren (BAV)** sind ebenfalls entero- und pneumotrop. Sie verursachen vor allem bei jüngeren Kälbern eine Pneumoenteritis (27,39). Schipper et al. (52) wiesen 1971 die Beteiligung von Adenoviren an Respirationstrakterkrankungen des Rindes in der Schweiz nach. In Österreich fanden sich bei 68% der untersuchten Schlachtkälber Antikörper gegen BAV-1 und 83% gegen BAV-4 (12). Andere Autoren stellten Durchseuchungsraten von 70-75% in der Rinderpopulation fest (27,30,37,59). Von den 8 BAV-Serotypen wurden für unsere Untersuchungen der Typ 1 als Vertreter der Subgruppe A (Typ 1-3), und der Typ 4 als Vertreter der Subgruppe B (Typ 4-8) ausgewählt.

Bei einer Infektion mit dem **Virus der bovinen Virusdiarrhoe (BVDV)** werden auch respiratorische Symptome wie Augen- und Nasenausfluss, Dyspnoe, Atemgeräusche bis hin zum Husten und Pneumonie beobachtet. Bei Untersuchungen des BRDC wurde deshalb das BVDV häufig miteinbezogen (7,33,35,36,38,51,53). So haben schon 1972 Schipper et al. (52) die Beteiligung von BVDV an Respirationstrakterkrankungen in der Schweiz untersucht .

Für die Entstehung von respiratorischen Erkrankungen beim Rind werden infektiöse und nicht infektiöse Faktoren verantwortlich gemacht. Da die nicht infektiösen wie z.B. Tierhandel, Stallklima, Management nicht immer im gewünschten Masse zu beeinflussen sind, richtet sich das Augenmerk des behandelnden Tierarztes vor allem auf die infektiösen Ursachen, wie Bakterien, (inklusive Mykoplasmen und Chlamydien) sowie Viren. Da letztere chemotherapeutisch nicht anzugehen sind, drängt sich der Einsatz von Impfstoffen als prophylaktische Massnahme auf. Sowohl eine Behandlung wie auch eine Impfung kann aber nur sinnvoll betrieben werden, wenn das Erregerspektrum bekannt ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, abzuklären, welche aetiologische Rolle das bovine respiratorische Synzytialvirus (BRSV), das Parainfluenzavirus Typ 3 (PI-3), das bovine Coronavirus (BCV), die bovinen Adenoviren Typ 1 und Typ 4 und das Virus der bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) bei

Respirationstrakterkrankungen des Rindes im Winter 86/87 spielten. Weiter sollte eine Methode für den Nachweis von Antigen (indirekte Immunfluoreszenz) und von Antikörpern (ELISA) bei Infektionen mit bovinen Adenoviren und bovinen Coronaviren etabliert werden.

Es wurden 45 Betriebe untersucht. Dabei standen Infektionen mit den bovinen Adenoviren, mit dem respiratorischen Synzytial- und dem bovinen Coronavirus im Vordergrund. Nur in 2 Betrieben war keines der untersuchten Viren nachzuweisen.

1.1. LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

AG	Antigen
AK	Antikörper
Akutserum	Während der akuten Phase der Krankheit entnommenes Serum
ATCC	American Tissue Culture Collection
BAV-1/4	Bovines Adenovirus Typ1/Typ4
BCV	Bovines Coronavirus
BRDC	Bovine Respiratory Disease Complex
BRSV	Bovines Respiratorisches Synzytialvirus
BVDV	Bovines Virus Diarrhoe Virus
d	Tag (dies)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
E-MEM	Eagle's Minimal Essential Medium
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FPCIU	Fluorescence Positive Cells Inducing Units
GK	Gewebekultur
h	Stunde (hour)
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
i.m.	intramuskulär
inakt.	Vakzine aus inaktivierten Viruspartikeln ("Totvakzine")



Ka-HoZ	Kälberhoden-Zellen (Primärzellen)
M-Mc-A-BRSV	Monoklonale Antikörper gegen BRSV der Maus
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney Zellen
MD/VD oder BVDV	Mucosal Disease Bovine Virus Diarrhea- oder Bovines Virusdiarrhoe Virus
mlv	modifizierte "Lebend"vakzine
NE	Nettoextinktion
Δ NE	Nettoextinktionsdifferenz
PBS	Phosphate Buffered Saline
p.i.	post infectionem
p. inoc.	post inoculationem
PI-3	Parainfluenza Typ 3
R-A-BAV-1	Kaninchen-Antikörper gegen BAV-1 (rabbit)
R-A-BAV-4	Kaninchen-Antikörper gegen BAV-4
R-A-BCV	Kaninchen-Antikörper gegen BCV
R-A-B-PO	Kaninchen-Antikörper gegen Rinderantikörper mit Peroxidase markiert
R-A-PI-3	Kaninchen-Antikörper gegen PI-3
RT	Raumtemperatur
rpm	runs per minute
s.c.	subkutan
TCID ₅₀	Tissue Culture Infectious Dose 50%
TNE	Tris-NaCl-EDTA (Pufferlösung)
Vero-Zellen	African Green Monkey Kidney Cells

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Zur Untersuchung gelangten Nasentupfer- und gepaarte Blutproben. Diese wurden hauptsächlich in 4 Praxen im Kanton Zürich sowie im Einzugsgebiet der Ambulatorischen Klinik des Tierspitals Zürich entnommen. Zusätzlich stammten 4 Proben aus einem Bestand im Kanton Aargau. Die Betriebe wurden von den mitarbeitenden Tierärzten gemeldet, wenn sie die typischen Symptome einer Respirationstrakterkrankung bei mindestens einem Tier beobachteten. Die Symptome bestanden in Augen- und Nasenausfluss, Husten, oft auch Fieber (bis zu 40,5° C), Dyspnoe, Fressunlust und allgemeiner Apathie. Da der Virusantigennachweis nur zu Beginn der Krankheit erfolgreich ist, wurden die Betriebe noch am gleichen oder spätestens am darauffolgenden Tag besucht und bei mindestens zwei, durchschnittlich 3 Tieren Proben entnommen. Dabei wurden auch klinisch gesund erscheinende Nachbartiere miteinbezogen. In der Zeit vom Oktober 86 bis Mai 87 kamen Proben von 123 Tieren aus 45 Betrieben (19 Mastbetriebe, 26 konventionelle Milchbetriebe) zusammen. Das Alter der Tiere schwankte zwischen einer Woche und 5 Jahren, wobei vor allem die Tiere im Alter von 2 bis 18 Monaten betroffen waren. Nur in zwei Fällen waren auch Milchkühe erkrankt.

2.2. IMMUNPROPHYLAKTISCHE MASSNAHMEN IN DEN BETRIEBEN

Drei Mastbetriebe hatten für diese Winterperiode geimpft, und zwar einer mit Bovigrip® (PI-3, BAV-1 und -3, Reo 1 und 3, inakt.) der Firma Sintco, Basel, Schweiz, ein anderer mit Pneumovac Plus® (PI-3, BAV-3, Reo 3 und MD/VD, inakt.) der Firma Biokema, Crissier, Schweiz und der dritte mit Immuresp P® (PI-3, mlv) der Firma Gräub, Bern, Schweiz.

2.3. NASENTUPFERPROBEN

Die Entnahme der Nasentupferproben erfolgte mit sterilen Wattetupfern (IVF, Schaffhausen, Schweiz), welche möglichst tief in jede Nasenöffnung eingeführt

und mit leichtem Druck gegen das Nasendach abgestreift wurden, um möglichst viele Nasenepithelzellen zu erhalten. Diese Tupfer wurden in Transportmedium (E-MEM mit 2% FCS, s. Kap. 2.6.), welches steril in Universal-Fläschchen (Serolab®, Facola, Basel, Schweiz) abgefüllt worden war, ausgequirlt und am Gefässrand gut ausgedrückt, um ein Maximum an Zellen aus dem Wattetupfer zurückzugewinnen. Zur Verhinderung des Zellerfalls, wurden die Fläschchen in einer Kühlbox bei 4° C aufbewahrt und möglichst rasch zur Weiterverarbeitung ins Labor gebracht.

2.4. SERUMGEWINNUNG

Das Blut wurde in der Regel an der Halsvene entnommen, in Serumröhrchen (Röhrchen Nr. 26.326, Sarstedt, Sevelen, Schweiz) aufgefangen und ungekühlt ins Labor transportiert. Der Zeitraum zwischen der Entnahme der beiden Blutproben betrug durchschnittlich 3 Wochen, mit einem minimalen Intervall von 10 und einem maximalen von 28 Tagen. Im Labor wurden die Blutproben über Nacht bei 4° C gelagert, am nächsten Tag 20 Minuten bei 600 g zentrifugiert und das überstehende Serum in Polystyrolröhrchen (Sarstedt) dekantiert. Die Lagerung der Serumproben bis zum weiteren Gebrauch erfolgte bei -20° C.

2.5. VIREN

Es wurden der Stamm VR-885 Iowa (FS1-1) (ATCC, Parklawn Drive, Rockville, Maryland, USA) des bovinen respiratorischen Synzytialvirus (BRSV) und der Stamm VR-739 (ebenfalls ATCC) des bovinen Parainfluenza Typ-3 Virus (PI-3) verwendet (19).

Als bovinen Adenovirus Typ 1 (BAV-1) stand uns der Stamm V11/66, EKN P9, MDBK P11, (Prof. Peterhans, Bern) und als bovinen Adenovirus Typ 4 (BAV-4) der Stamm V14/66, KaHo P11, (Prof. Bürki, Wien) zur Verfügung. Das ursprünglich aus dem Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska, USA stammende bovine Coronavirus verdanken wir Herrn PD H. Lutz (5).

2.6. ZELLEN UND VIRUSVERMEHRUNG

Die BRSV und PI-3-Vermehrung sowie die Herstellung der Hyperimmunseren gegen diese Viren sind früher beschrieben worden (19).

Das BCV liess sich in VERO-Zellen vermehren. Ebenfalls mit Verozellen wurde die Spezifitätskontrolle und Verdünnungsoptimierung des Rabbit-Anti-BCV-Hyperimmunserums (R-A-BCV) durchgeführt (siehe 2.8.2.).

Das BAV-1 wurde in Madin-Darby bovine kidney cells (MDBK) angezüchtet und vermehrt. Auch für die Antigenproduktion zur Herstellung der Hyperimmunseren im Kaninchen und für die Kontrolle des Antiserums im Immunfluoreszenztest auf Objektträgern (Bio Mérieux, über API, Genève, Schweiz), kam diese Zelllinie zur Anwendung. Die primäre Virusvermehrung erfolgte in 150-cm²-Zellkulturflaschen (Corning Glass Works, Corning, N.J., USA) und die Virus-Grossproduktion in 490-cm²-Rollerflaschen (ebenfalls Corning Glass Works). BAV-4 wurde in primären Kälberhoden-Kulturen (KaHo) in 150-cm²-Flaschen angezüchtet und vermehrt, da sich dieser Serotyp ausschliesslich in diesen Zellen reproduziert. Die Prüfung des entsprechenden Antiserums erfolgte ebenfalls mit Ka-Ho-Zellen, die in Slide-Flasks (Nunc, Roskilde, Denmark) angezüchtet worden waren. Die KaHo-Primärkulturen wurden aus Hoden von frisch geschlachteten Mastkälbern nach der Standardmethode präpariert (34). Auf die sterile Entnahme des Hodengewebes und die Entfernung des Samenstranges folgte eine mechanische Zerkleinerung. Dann rührte man die Gewebesuspension 20 Minuten in PBS auf dem Orbitalshaker, liess das Gewebe sedimentieren und dekantierte den Überstand. Das Sediment wurde mit 0,25%-igem Trypsin (DIFCO, Chemie Brunschwig, Basel, Schweiz) in PBS während 5 Minuten auf dem Orbitalshaker behandelt. Die PBS-Waschung und die Trypsinbehandlung wurden wie oben beschrieben wiederholt und die 2 Überstände durch Gaze in einer Büchner-Nutsche filtriert. Die filtrierte Zellsuspension wurde 10 Minuten lang bei 160 g zentrifugiert, der Überstand abgesogen und die in Medium resuspendierten Zellen (10⁶ Zellen/ml) ausgesät.

2.7. MEDIEN

Für die Kultur der MDBK- und der Vero-Zellen wurde Eagle's Minimal Essential Medium (E-MEM, Amimed, Basel, Schweiz) mit folgenden Zusätzen eingesetzt:

100 IE/ml Penicillin Novo und 100 µg /ml Streptomycin (Novo Industri, A/S, Kopenhagen, Dänemark), fötales Kälberserum (FCS, Nabi, Florida, USA). Dem Anzuchtmedium wurden 10% FCS und dem Erhaltungsmedium 0% respektive 2% FCS zugegeben .

Bei den KaHo-Zellen wurde Medium 199 (M-199, w. Hank's Salts, Kat. Nr. 071-1200, Gibco, Basel, Schweiz) verwendet, mit den folgenden Zusätzen:

Lactalbuminhydrolysat	50 mg/ml
(Difco Lab., Detroit 1, Michigan, USA)	
Fötales Kälberserum (FCS)	5%, resp. 2% oder 0%
(s. oben)	
Hefe-Extrakt	10 µg/ml
(Becton-Dickinson, Basel, Schweiz)	
Neomycin	10 µg/ml
(Syntex Pharm AG, Allschwil, Schweiz)	
Streptomycin	100 µg/ml
(s. oben)	
Penicillin Novo	100 IE/ml
(s. oben)	
Hepes-Puffer 2M	1 ml/100 ml
(Chemicon, NABI North American Biologicals Incorp., Vertretung in der Schweiz Ackermann, Riehen, Schweiz)	
NaOH 0,3 M	1 ml/100 ml
(Merck, Darmstadt, Vertretung in der Schweiz Bender und Hobein, Zürich, Schweiz)	

2.8. ANTIGENPRÄPARATION

2.8.1. PRÄPARATION DES BRSV- UND DES PI-3-ANTIGENS

Die Antigenpräparation für den BRSV- und den PI-3-ELISA ist früher beschrieben worden (19).

2.8.2. PRÄPARATION DES BOVINEN CORONAVIRUS-ANTIGENS

Die von C.F.Crouch (14) beschriebene Antigen-Reinigung wurde von R. Kocherhans im Hause wie folgt modifiziert: Es wurden sechs 490cm² Roller-Flaschen mit konfluentem Verozellrasen mit je 4 ml Virussuspension ($10^{4,75}$ TCID₅₀/ml) plus 1 ml E-MEM 0% FCS infiziert und sechs Roller mit 5 ml serumfreiem E-MEM mockinfiziert. Nach 4 Stunden Adsorption wurde einmal mit PBS gewaschen und jeder Roller mit 30 ml serumfreiem E-MEM beschickt und bei 37° C bebrütet. Nach 6-7 Tagen wiesen ungefähr 80-90% der Zellen einen zytopathischen Effekt (ZPE) auf und es konnte mit der Aufarbeitung des Antigens begonnen werden. Das Medium wurde gepoolt, bei 4000 g 20 Minuten lang zentrifugiert (Heraeus, Laborgeräte AG, Zürich, Schweiz) und dieser 1. Überstand bei 4° C gelagert. Das Zellpellet wurde mit 20 ml frischem serumfreiem E-MEM in die Rollerflaschen zurückgegeben. Mit einem Magnetrührstab wurden die noch haftenden Zellen durch kreisende Bewegung von der Flasche abgelöst. Die so gewonnene Gesamtheit der Zellen wurde direkt in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt, 30 Minuten lang bei -70° C eingefroren, leicht angetaut und dann mit Hilfe von Ultraschall (Sonifier® B30, SKAN, Basel, Schweiz, Microtip, circa 3 Minuten, mittlere Intensität) bis auf Raumtemperatur aufgetaut. Nachdem auf diese Art und Weise möglichst viele Zellen aufgeschlossen worden waren, wurde das Ganze 20 Minuten lang bei 4000 g (Heraeus) zentrifugiert. Der so gewonnene 2. Überstand wurde zum 1.Überstand gegeben und ultrazentrifugiert (4 Stunden bei 4°C, bei 80000 g resp. 21000 rpm, im Rotor SW27/28), um das Virus zu pelletieren. Das Pellet wurde zusammen mit 0,8 ml TNE-Puffer über Nacht bei 4° C im Kühlschrank stehengelassen. Am nächsten Tag wurde die Virussuspension auf einen linearen Saccharose-Dichtegradienten (20-60% in TNE-Puffer, 18 ml pro Röhrchen) geschichtet und im SW 27/28-Rotor 2 Stunden lang bei 4° C mit 95000g, resp. 23000 rpm zentrifugiert. Durch den Vergleich des virushaltigen mit dem mockinfizierten Gradienten, konnte die Virusbande im obersten Drittel des Röhrchens lokalisiert und gezielt abgesogen werden. Genau gleich wurde mit dem Negativ-Antigen-Röhrchen verfahren. Die saccharosehaltigen Fraktionen wurden mit PBS auf 14 ml verdünnt und noch einmal ultrazentrifugiert (2 Std., 4° C, 95000 g resp. 23000 rpm, SW 40 Rotor). Das entstandene Pellet wurde mit 3 ml PBS versetzt und über Nacht im Kühlschrank

bei 4° C gelassen. Dieses Ausgangsmaterial wurde anderntags austitriert (Microtiterplatten Microelisa®, Dynatech, Embrach, Schweiz), vorverdünnt und portioniert bei -70° C gelagert. Mit den 6 mockinfizierten Rollerflaschen wurde genau gleich verfahren, so dass man über ein Virus-Antigen und ein Kontroll-Antigen für die Durchführung des ELISA verfügte. Mit dem gleichen Material wurden auch die Hyperimmunseren im Kaninchen produziert.

2.8.3. PRÄPARATION DES BOVINEN ADENOVIRUS TYP 1 UND TYP 4-ANTIGENS

2.8.3.1. BAV-1-Vermehrung

Das BAV-1 wurde ebenfalls in 8 490 cm²-Rollerflaschen mit konfluentem MDBK-Zellrasen vermehrt. Infiziert wurde mit 2 ml Virussuspension ($10^{7,4}$ TCID₅₀/ml) plus 3 ml E-MEM 2% FCS und mit 5 ml E-MEM 2% FCS mockinfiziert. Nach 1 Stunde Adsorption wurden 50 ml E-MEM (2% FCS) dazugegeben und durchschnittlich 2 Tage gewartet, bis der zytopathische Effekt in Form von Abrundung und Ablösung 90% des Zellrasens betraf. Darauf folgte ein 3maliges Einfrieren und Auftauen (-20°C/RT), eine kurze Ultraschallbehandlung (30 sec., Microtip, mittlere Intensität) und das Abzentrifugieren der Zelltrümmer 20 Minuten lang bei 2000 rpm. Die so erhaltenen 400 ml Virussuspension und 400 ml Gewebekulturlflüssigkeit, stellten das Ausgangsmaterial für die eigentliche Reinigung dar.

2.8.3.2. BAV-4-Vermehrung

Für das BAV-4 mussten primäre KaHo-Zellen bereitgestellt werden (siehe 2.6.). Jeweils 20 150cm²-Flaschen wurden mit je 2 ml Virussuspension ($5,5 \times 10^7$ Fluorescence Positive Cell Inducing Units (FPCIU)/ml) plus 2 ml Medium M 199 5% infiziert, respektive 20 Flaschen mit 4 ml desselben Mediums mockinfiziert. Nach zwei Stunden Adsorption wurden 20 ml Medium M 199 mit 5% FCS zu jedem Flask zugegeben, und am nächsten Morgen nach 2-maligem Waschen mit PBS durch serumfreies Medium M 199 ersetzt. So erhielt man, wie beim BAV-1, 400 ml virushaltiges Antigen und 400 ml virusfreies Kontrollantigen, welches auch dem dreimaligen Einfrieren und Auftauen sowie einer

Ultraschallbehandlung (siehe 2.7.2.1.) unterzogen wurde, und als Ausgangsmaterial für die eigentliche Virusreinigung diente.

2.8.3.3. BAV-1- und BAV-4-Antigenreinigung

Für die Reinigung von BAV-1 und BAV-4 wurde eine Methode des Institutes für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien (Prof. F. Bürki) modifiziert. Jeder Schritt wurde immer zuerst für das virusfreie Kontrollantigen und dann für das virushaltige Antigen getrennt durchgeführt.

a) Genetronbehandlung (Beseitigen der Lipide):

Die Virussuspension wurde portionenweise mit Genetron 113 (Fluka AG, Buchs, Schweiz) gemischt, und zwar in einem Verhältnis von 7/10 Virussuspension zu 3/10 Genetron. Dieses Gemisch wurde mit dem Homogenisator (Polytron®, Kinematica, Kriens, Schweiz) 20 Sekunden lang bei maximaler Umdrehung homogenisiert, anschliessend 1/2 Stunde bei 2000g, 4° C zentrifugiert (Sorvall® RC-5B, GSA-Rotor) und der virushaltige Überstand sorgfältig abpipettiert.

b) Ausfällung der Proteine mit Ammoniumsulfat

Zu je 100 ml wässriger Virussuspension wurden 30 g Ammoniumsulfat (Merck, Darmstadt, BRD) gegeben, langsam über Nacht bei 4°C mit einem Magnetrührer gerührt und am nächsten Tag 1 Stunde lang bei 1000 g in 200 ml Bechern (Sorvall, GSA-Rotor) zentrifugiert. Die so entstandenen Ammoniumsulfatsedimente wurden mit je 15 ml bidestilliertem Wasser pro Becher resuspendiert, über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen und anschliessend nochmals 1/2 Stunde bei 1000 g zentrifugiert (Sorvall, GSA-Rotor)

c) Dialyse:

Der Überstand wurde in Dialyseschläuchen (Union Carbide, IG, Zürich, Schweiz) solange gegen PBS dialysiert, bis nach ca. 24-36 Stunden mit Nessler Reagens (Merck) keine Ausfällungsreaktion mehr sichtbar war.

d) Einengung:

Die Virussuspension wurde im Dialyseschlauch über Nacht mit PEG-60000

(Polyaethylen-Glykol, Merck, Darmstadt, BRD) eingeengt und am nächsten Tag mit PBS auf 1/40 des Ursprungsvolumens gebracht.

e) Ultrazentrifugation:

Als letzter Schritt wurde 1 Stunde lang bei 38 000 g (17 000 rpm, SW 60-Rotor) ultrazentrifugiert und das Pellet mit PBS resuspendiert.

f) Titration und Lagerung des Antigens:

Auf Microtiterplatten wurde die optimale Antigen-Gebrauchsverdünnung ausgetitriert, das Antigen entsprechend mit PBS vorverdünnt und portioniert bei - 60°C gelagert.

2.9. DURCHFÜHRUNG DES ELISA ZUM ANTIKÖRPER-NACHWEIS

2.9.1. NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN GEGEN BCV

Es wurde die schon beschriebene ELISA-Methode (19) übernommen.

2.9.2. NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN GEGEN BAV-1 UND BAV-4

Die ELISA-Methode beruhte auf einer leicht abgeänderten Vorschrift des Institutes für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität, Wien (Prof. F. Bürki). In Microtiterplatten wurde das Virus- und das Kontrollantigen nach der gleichen Anordnung wie schon beschrieben (19), aber mit nur 100 µl/Delle und während 48 Stunden bei 4°C gecoatet. Nach gründlichem Trockenklopfen wurde 250 µl/Delle PBS mit 1% Gelatine (Merck) eingefüllt, die Platten mit einer selbstklebenden Folie (Art.Nr. 001-010-5701, Dynatech, Embrach, Schweiz) zugeklebt und 2,5 Stunden im Wasserbad bei 37°C schwimmen gelassen. Nach diesem Blocking-Schritt wurden die Platten wieder ausgeklopft, die Patientenseren (100 µl/Delle) in einer Grundverdünnung von 1:40 eingefüllt und ausgetitriert (siehe 2.8.1.). Als Verdünnungslösung diente PBS mit 3% Tween-20 (Bender und Hobein, Zürich, Schweiz) und 1% Gelatine. Auf jeder Platte wurde auch ein bekanntes BAV-Antiserum und ein bekannt negatives Kontrollserum mitgeführt. Die Platten wurden wiederum zugeklebt und diesmal eine Stunde im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Bevor das Konjugat (R-A-B-PO, Bommeli, Bern,

100 µl/Delle, 1:500 in PBS-Tween-20 3%, Gelatine 1%) eingefüllt wurde, wurden alle Dellen 6 mal gründlich mit PBS-Tween-20 0,05% gewaschen (Nunc-Wash, 8-Kanal) und die zugeklebten Platten anschliessend 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Platten wurden wieder, wie oben beschrieben, sorgfältig 6 mal gewaschen und anschliessend 200 µl Indikator-Substrat (ABTS®, verdünnt 1,097 g/l) in jede Delle gegeben. ABTS ist ein Produkt der Firma Boehringer, Mannheim, BRD. Nach einer Inkubation von einer Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur beurteilte man optisch den Farbumschlag. Die Verdünnungsstufe, bei der keine Differenz mehr zum Kontrollantigen sichtbar war, wurde von Auge abgelesen. Der Reziprokwert dieser Verdünnung galt als Titer dieses Serums. So konnte ein eventueller Titeranstieg bei Akut- und Rekonvaleszentenserum erfasst werden. Zusätzlich wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm (Titertek Multiskan, Flow Lab. AG, Baar, Schweiz) die ΔNE jedes Serums bestimmt, um den Titerverlauf unabhängig von etwaigen Background-Reaktionen beurteilen zu können. ($\Delta NE = NE_{\text{Rekonvaleszentenserum}} - NE_{\text{Akutserum}}$, wobei $NE = \text{Bruttoextinktion Virusantigen} - \text{Bruttoextinktion Kontrollantigen}$).

2.9.3. NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN GEGEN BVDV

Grosszügigerweise wurde der Nachweis des Titeranstieges gegen das BVD-Virus vom Institut für Veterinär-Virologie der Universität Bern (Prof. E. Peterhans) mittels eines dort entwickelten ELISA-Verfahrens durchgeführt.

2.10. HERSTELLUNG DER ANTISEREN FÜR DEN VIRUSANTIGEN-NACHWEIS IN NASENTUPFERPROBEN MITTELS INDIREKTER IMMUNFLUORESCENZ (IIF)

Für den Virus-Antigen-Nachweis in den Nasentupferproben wurden monospezifische Antiseren gegen die Viren produziert.

2.10.1. HERSTELLUNG VON ANTISEREN GEGEN DAS BRSV (M-Mc-A-BRSV) UND DAS PI-3 (R-A-PI-3)

Die monoklonalen Antikörper und das Antiserum wurden im hiesigen Institut hergestellt (19). Für den BRSV-Antigennachweis diente ein Gemisch von 3

monoklonalen Antikörpern (M-Mc-A-BRSV) und für den PI-3-Antigennachweis das entsprechende Kaninchen-Anti-PI-3-Serum (R-A-PI-3).

2.10.2. HERSTELLUNG VON KANINCHENANTISERUM GEGEN DAS BCV (R-A-BCV)

Ein ca. 3.5 kg schweres Kaninchen wurde mit dem gereinigten BCV-Antigenmaterial (2.8.2.) nach folgendem Schema immunisiert: Vorerst wurde an der Ohrdrandvene Blut für ein Präimmunserum dieses Tieres entnommen. Am Tag 0 wurde mit 0,5 ml Antigen plus 0,5 ml komplettem Freund'schem Adjuvans (Difco Lab., Detroit, Michigan, USA) die Grundimmunisierung durchgeführt und zwar subkutan an vier verschiedenen Stellen des Körpers. Am 40. Tag erfolgte der 1. Booster, am 50. Tag der 2. Booster mit der gleichen Menge Antigen, ohne Adjuvans, aber s.c. und i.m.. Am Tag 52 p. inoc. wurde das Tier unter Rompun®-Ketalar®-Narkose aus der V. jugularis entblutet. Das nach Zentrifugation (20 Minuten bei 600 g) gewonnene Serum wurde portioniert bei -20°C gelagert. Vor Beginn der Immunisierung und bei jeder weiteren Impfung wurde an der Ohrdrandvene Blut entnommen, um den Antikörpertiterverlauf zu verfolgen. Für die Titerbestimmung wurden Deckglaskulturen von Verozellen mit BCV infiziert, respektive als Negativkontrolle mit Medium mockinfiziert. Bei beginnendem ZPE (nach 3-4 Tagen) wurden die Deckgläser fixiert (10 Minuten in Azeton bei 4°C) und bei -20°C gelagert. Auf diesen Deckgläsern wurde mittels IIF die höchstmögliche Serumverdünnung ermittelt, bei der das Virusantigen ohne unspezifische Reaktionen noch gut erkennbar markiert wurde. Für das R-A-BCV lag diese Verdünnung bei 1:400.

2.10.3. HERSTELLUNG VON KANINCHENANTISEREN GEGEN DAS BOVINE ADENOVIRUS TYP 1 UND DAS BOVINE ADENOVIRUS TYP 4 (R-A-BAV-1 UND R-A-BAV-4)

Je ein Kaninchen wurde mit dem Antigenmaterial wie unter 2.8.3. beschrieben immunisiert. Es wurde ein ähnliches Immunisierungsschema wie beim BCV (2.10.1) angewandt:

Zuerst Gewinnung des Praeimmunserums. Tag 0 Grundimmunisierung mit 0,5 ml Virusantigen, gemischt mit 0,5 ml komplettem Freund'schem Adjuvans, Tag 15 erster Booster, Tag 25 zweiter Booster (0,5 ml s.c. und i.m.), Tag 28

Rompun®-Ketalar®-Narkose und entbluten aus der V.jugularis. Der Verlauf des Antikörpertiters im Serum wurde durch Blutentnahmen aus der Ohrdrandvene vor jeder weiteren Antigenapplikation bestimmt. Bei BAV-1 wurden für die IIF infizierte und nicht infizierte MDBK-zellen auf azetonbeständigen Objektträgern (Bio Mérieux, Charbonnières les Bains, France) verwendet. 24 Stunden p.i arbeitete man die Zellen auf, fixierte sie 10 Minuten in Azeton bei 4°C und lagerte sie anschliessend bei -20°C. Die optimale Verdünnung des R-A-BAV-1 betrug 1:2000. Bei BAV-4 fanden für die IIF in Slide-Flasks (Nunc, Roskilde, Denmark) gezüchtete KaHo-Zellen, die, 5 Tage p.i., 10 Minuten in Aethanol bei 4°C fixiert wurden, Verwendung. Das R-A-BAV-4 war optimal 1:200 zu verdünnen.

2.11. VIRUSANTIGENNACHWEIS MITTELS INDIREKTER IMMUN-FLUORESZENZ (IIF)

2.11.1. IIF ALLGEMEIN

Die Aufarbeitung der Nasentupferproben und der daraus gewonnenen Nasenepithelzellen, sowie die Durchführung der IIF wurden früher (19) beschrieben. Wenn bei der Beurteilung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Dialux Typ 0-20, Wild und Leitz, Zürich) in einer Zelle die typischen, fluoreszierenden Granula im Zytoplasma respektive im Kern beobachtet wurden, galt der Virusnachweis beim betreffenden Tier als erbracht.

2.11.2. IFF SPEZIELL

Für den Antigennachweis von BCV wurde das R-A-BCV (2.10.2.) in einer Gebrauchsverdünnung von 1:400 in PBS eingesetzt. Das R-A-BAV-1 konnte 1:2000 und das R-A-BAV-4 (2.10.3.) 1:200 verdünnt werden. Als zweiter Antikörper kam ein Schwein-Anti-Rabbit-FITC (Nordic Immunological Lab., Tilburg, Holland), verdünnt 1:40 in PBS zur Anwendung.

Das BCV zeigte die für ein RNA-Virus typische zytoplasmatische Fluoreszenz (Abb. 1) und bei BAV war Kernfluoreszenz zu beobachten (Abb. 2).

2.12. NACHWEIS EINER VIRUSINFEKTION

Eine Infektion galt als nachgewiesen, wenn sie mit mindestens einer Methode (direkt mit Virusantigennachweis oder indirekt mit Antikörpertiteranstieg) festzustellen war. Auf BRSV, PI-3, BCV, BAV-1 und BAV-4 wurde sowohl indirekt wie auch direkt, auf BVDV nur serologisch untersucht.

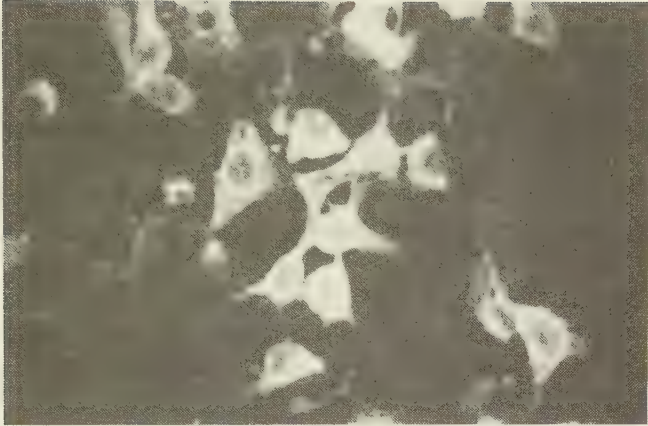


Abb. 1: Nachweis von BCV-Antigen in Deckglaskulturen von Verozellen mittels indirekter Immunfluoreszenz.

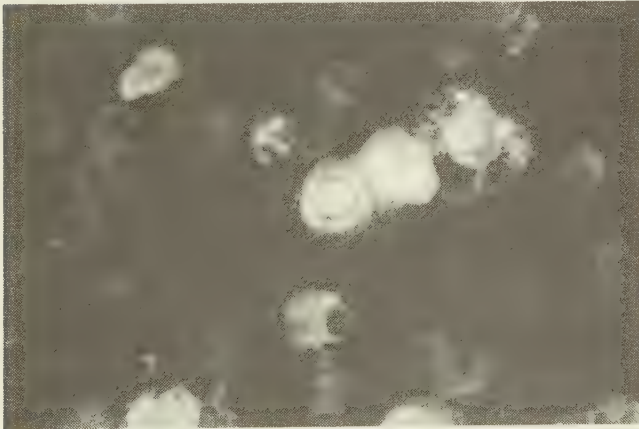


Abb. 2: Nachweis von BAV-1-Antigen in Slide Flask Kulturen von Kälberhodenzellen mittels Immunfluoreszenz. Der Nachweis des BAV-4-Antigens mit dem gleichen Nachweisverfahren ergab vergleichbare Bilder.

3. RESULTATE

3.1. BRSV, PI-3, BCV, BAV-1 UND BAV-4: ANTIGEN- UND ANTIKÖRPERNACHWEIS

3.1.1. ERGEBNISSE BEI DEN EINZELTIEREN

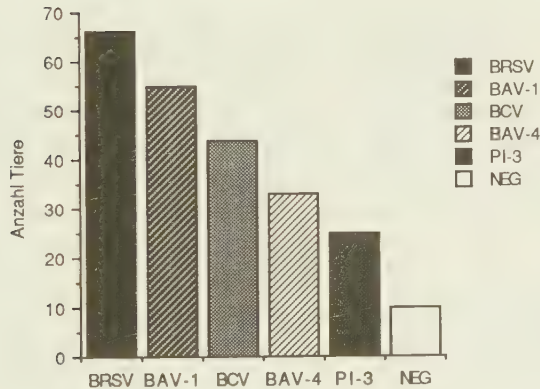
Bei den 123 untersuchten Tieren kam eine BRSV-Infektion am häufigsten vor (66 Tiere = 53%), gefolgt von BAV-1-Infektionen (55 Tiere = 45%), BCV-Infektionen (44 Tiere = 36%), BAV-4-Infektionen (33 Tiere = 27%) und PI-3-Infektionen (25 Tiere = 20%).

(Siehe Abb. 3)

Ein übereinstimmender Nachweis von Virusantigen und eines Antikörpertiteranstiegs konnte für das BRSV in der Hälfte der festgestellten Infektionen geführt werden. Für das PI-3 und das BAV-4 fand sich diese Übereinstimmung in 1/5, beim BCV in 1/3 und beim BAV-1 in 1/6 der Fälle. In den restlichen Erkrankungsfällen war entweder nur Virusantigen oder nur ein Antikörpertiteranstieg nachweisbar (Tabelle 1).

Abb. 3

Häufigkeit von Infektionen mit BRSV, PI-3, BCV, BAV-1 und BAV-4 bei 123 untersuchten Tieren. Es wurden sowohl Einzel- wie auch Mehrfachinfektionen berücksichtigt. Der Nachweis erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz in den Nasentupferproben (Virusantigennachweis) und/oder mittels ELISA (Antikörpertiteranstieg).



Auch in Tabelle 1 zeigt sich das BRSV- und BAV-1 Infektionen am häufigsten vorkamen.

Hier ist anzumerken, dass bei einem untersuchten Tier ein gelungener Virusantigennachweis ohne feststellbaren Antikörpertiteranstieg nicht als widersprüchliches Resultat gelten muss (4,25, und Kap.4.1.). Das Gleiche trifft für den umgekehrten Fall zu.

Tabelle 1: Die Häufigkeit des Nachweises verschiedener Virusinfektionen mittels indirekter Immunfluoreszenz (Virusantigennachweis) und mittels ELISA (Antikörpertiteranstieg) bei 123 untersuchten Tieren. Es wurden sowohl Einzel- wie auch Mehrfachinfektionen berücksichtigt. a = Zahl der Tiere

Infektion mit	Nachweis				Kein Nachweis einer Virusinfektion
	Antigen und Antikörperanstieg	Antigen	Antikörperanstieg	Total	
BRSV	33 ^a	20	13	66	57
PI-3	5	5	15	25	98
BCV	16	13	15	44	79
BAV-1	9	31	15	55	60
BAV-4	7	18	8	33	90

3.1.2. VIRUSINFESTIONEN IN DEN 45 BETRIEBEN, AUS DENEN DIE EINZELTIERE STAMMTEN

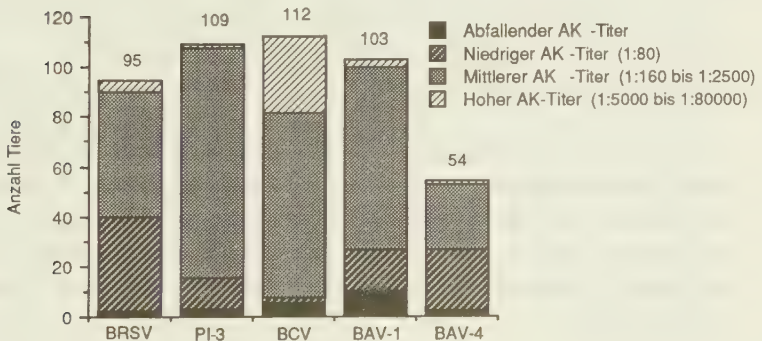
Es wurden minimal 1 Tier und maximal 5 Tiere pro Bestand untersucht. Nur in zwei Betrieben liess sich keine Virusinfektion nachweisen. Aufgrund der hohen Durchseuchungsraten in der Rinderpopulation war ein solches Resultat eigentlich zu erwarten (s. Abschnitt 3.1.3). In 34 Betrieben fanden sich BAV-1, in 29 BRSV, in 27 BAV-4, in 22 BCV- und in 16 Betrieben PI-3 Infektionen. BAV-1, BRSV und BAV-4 Betriebsinfektionen waren am häufigsten, gefolgt von den BCV-Infektionen. PI-3 Infektionen dagegen kamen im Winter 1986/87 deutlich weniger oft vor, wie das schon im Winter 1985/86 festgestellt wurde (20).

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Einzeltieren und von Betrieben stimmten im grossen und ganzen überein, so dass auf eine graphische und tabellarische Darstellung der Resultate nach Beständen verzichtet werden kann. Auch in bezug auf die Nachweisverfahren (Virusantigen, Antikörpertiteranstieg) zeigten die Untersuchungen von Einzeltieren und von Betrieben übereinstimmende Ergebnisse.

3.1.3. IMMUNITÄTSLAGE DER TIERE BEI DER ERSTEN UNTERSUCHUNG

In 77-91% der Akutseren klinisch kranker Tiere fanden sich Antikörper gegen BRSV, PI-3, BCV und BAV-1. Einzig gegen BAV-4 wiesen nur 44% der Patienten Antikörper auf, dabei waren mittlere Titerwerte (1: 160 bis 1: 2500) am häufigsten. Diese Zahlen geben ein Bild von der hochgradigen Verbreitung der 5 Viren in der Rinderpopulation. Ob die Antikörpertiter auf früher durchgemachte Infektionen zurückzuführen sind, oder ob es sich um maternale Antikörper handelt, lässt sich nicht entscheiden.

Abb.4: Häufigkeit der in Akutseren festgestellten Antikörpertiter gegen BRSV, PI-3, BCV, BAV-1 und BAV-4 bei 123 untersuchten Tieren.



Aus Abb. 4 wird ersichtlich, dass nur ein kleiner Teil der Tiere im Akutserum keine Antikörper gegen eines der in die Untersuchung einbezogenen Viren

aufwies. Bei den restlichen Tiere liessen sich Titer zwischen 1:80 bis 1:80 000 nachweisen. Bei einigen Tieren wurde ein Titerabfall beobachtet (mindestens 4-fach), nämlich bei 2 Tieren gegen BRSV, bei 3 gegen PI-3, bei 5 gegen BCoV, bei 10 gegen BAV-1 und bei 2 gegen BAV-4.

3.2. ÜBEREINSTIMMUNG DER ERGEBNISSE BEI DIREKTEM UND INDIREKTEM VIRUSNACHWEIS

3.2.1. VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER DIREKTEN UND INDIREKTEN NACHWEISMETHODE BEI DER UNTERSUCHUNG VON EINZELTIEREN

Beim Vergleich der Ergebnisse des direkten Virusnachweises mittels Immunfluoreszenz (Virusantigen) und des indirekten Virusnachweises mittels ELISA (Anstieg des Antikörpertiters) konnte, wie schon erwähnt, keine totale Übereinstimmung der Resultate festgestellt werden. Meist war bei den betreffenden Tieren nur der Nachweis von Virusantigen möglich, jedoch keine Serokonversion festzustellen. In einigen wenigen Fällen war aber auch eine Serokonversion zu beobachten, ohne dass der Virusantigennachweis gelang. Nicht übereinstimmende Ergebnisse bei direktem und indirektem Virusnachweis fanden sich bei allen fünf Virusinfektionen in etwa 1/4 der insgesamt 123 untersuchten Fälle (Tabelle 2). Dabei stimmten die Ergebnisse bei PI-3-Infektionen am besten überein (5/6 der Tiere). Die schlechteste Übereinstimmung (bei 1/3 der Tiere) war bei BAV-1-Infektionen zu beobachten.

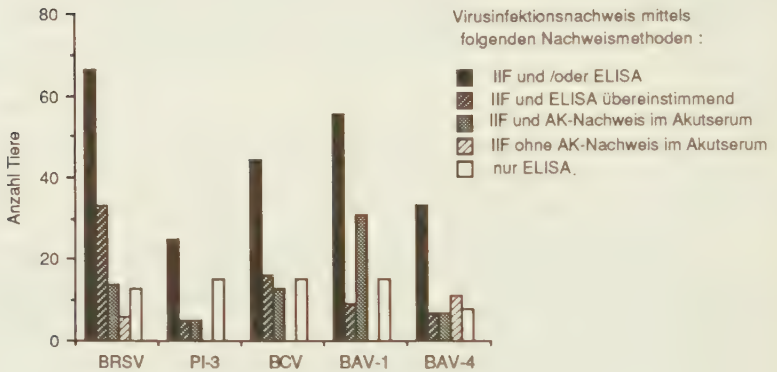
Tiere, bei denen der Nachweis der Infektion nur mittels Virusantigennachweis gelang, wiesen meistens einen vorbestehenden Antikörpertiter im Akutserum (dem während der akuten Phase der Krankheit entnommenen Serum) auf. Solche schon vorhandenen Antikörper vermögen bei einer Infektion wahrscheinlich einen Anstieg des Antikörpertiters im Serum zu verhindern (siehe Diskussion).

Tabelle 2: Nicht übereinstimmende Ergebnisse des direkten und indirekten Nachweises einer Virusinfektion bei 123 untersuchten Einzeltieren. (Zähler : Total der nicht übereinstimmenden Ergebnisse, Nenner: Anzahl untersuchter Tiere)

Infektion mit	Nur direkter Virusantigennachweis mittels IIF	Nur indirekter Virusnachweis mittels ELISA (Antikörpertiteranstieg)	Total
BRSV	bei 20 Tieren	bei 13 Tieren	33/123
PI-3	5	15	20/123
BCV	13	15	28/123
BAV-1	31	15	46/123
BAV-4	18	8	26/123

Die Ergebnisse der Tiere, bei denen der Nachweis einer Infektion nur mittels Virusantigennachweis gelang, und bei denen im Akutserum ein vorbestehender Antikörpertiter festzustellen war, wurden aus den obigen Gründen zu den übereinstimmenden Resultaten gerechnet. Damit verringerte sich der Anteil nicht übereinstimmender Ergebnisse bei Infektionen mit BRSV und BAV-4 auf je 19 Tiere, bei Infektionen mit PI-3, BCV und BAV-1 auf je 15 Tiere. Diese Zahlen stellen für jede Virusinfektion die Summe der Anzahl Tiere in den letzten 2 Säulen in Abb. 5 dar ("Nur IIF ohne AK-Nachweis im Akutserum" plus "nur ELISA"). Das ergibt etwa 1/8 nicht übereinstimmende Ergebnisse des direkten Virusantigennachweises und des indirekten serologischen Nachweises.

Abb. 5: Übereinstimmung der Ergebnisse des direkten Virusantigennachweises und des indirekten serologischen Nachweises einer Infektion. Fälle, bei denen der Virusantigennachweis gelang und bei denen im Akutserum schon Antikörper nachzuweisen waren, sind berücksichtigt. IIF = Nachweis von Virusantigen mittels indirekter Immunfluoreszenz. ELISA = Nachweis des Antikörperiteranstieges.



3.2.2. VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER DIREKTEN UND INDIREKTEN VIRUSNACHWEISMETHODE BEZOGEN AUF DIE BETRIEBE

Ein Vergleich der Ergebnisse der Betriebsuntersuchungen ist in Tabelle 3 zusammengestellt. Daraus ergibt sich, dass trotz Untersuchung von durchschnittlich 3 Tieren pro Betrieb, die Ergebnisse der direkten und der indirekten Nachweismethoden nicht wesentlich besser übereinstimmten als bei der Einzeltieruntersuchung. Am besten war diese Übereinstimmung noch bei BCoV-Infektionen (1/5 der untersuchten 45 Bestände) und am schlechtesten wieder bei BAV-1-Infektionen (1/2 der untersuchten 45 Bestände). Bei der geringen Anzahl untersuchter Tiere pro Betrieb war kein Rückschluss auf die allgemeine Immunitätslage der Tiere im Betrieb möglich.

Tabelle 3: Nicht übereinstimmende Ergebnisse des direkten und indirekten Nachweises einer Virusinfektion bezogen auf 45 untersuchte Betriebe. (Zähler : Total der nicht übereinstimmenden Ergebnisse, Nenner: Anzahl untersuchter Betriebe)

Infektion mit	Nur direkter Virus-antigennachweis mittels IIF	Nur indirekter Virus-nachweis mittels ELISA (Antikörpertiteranstieg)	Total
BRSV	in 7 Betrieben	in 3 Betrieben	10/45
PI-3	2	10	12/45
BCV	2	7	9/45
BAV-1	12	10	22/45
BAV-4	13	5	18/45

3.3. ERGEBNISSE DER SEROLOGISCHEN UNTERSUCHUNG AUF BVD-VIRUS

Es wurden Seren von 110 Tieren aus 40 Betrieben auf einen Antikörpertiteranstieg gegen BVD-Virus mittels ELISA untersucht. Ein Antikörpertiteranstieg und somit eine Infektion mit dem BVD-Virus konnte bei 21 Tieren und in 14 Betrieben nachgewiesen werden. Von den 110 untersuchten Tieren wiesen etwas mehr als die Hälfte (62 Tiere) Antikörper gegen das BVD-Virus im Akutserum auf. Bei mehr als der Hälfte der 62 Akutseren mit Antikörpern gegen BVDV war ein niedriger Titer festzustellen, was wahrscheinlich auf die Präsenz maternaler Antikörper hindeutet.

3.4. INFektionen MIT EINEM ODER MEHREREN VIREN (Einzel- und Mehrfachinfektionen)

Interessanterweise war nur bei 1/4 der untersuchten 123 Tiere eine Monoinfektion mit BRSV, BCV, BAV-1 und BAV-4 nachweisbar. Mit PI-3 und BVDV fanden sich keine Einzelinfektionen. Eindeutig häufiger waren Mehrfachinfektionen, wobei bis zu 5 Viren bei einem kranken Tier nachweisbar waren. Tabelle 4 gibt eine Uebersicht über Mono- und Mehrfachinfektionen in 45 untersuchten Betrieben. Dabei zeigte sich, dass keines der Viren in vermehrter Masse an Mehrfachinfektionen beteiligt war.

Tabelle 4: Synopsis der Einzel- und Mehrfachinfektionen und deren Kombinationen in 45 untersuchten Betrieben.

		Betriebe	Total
Einfach- infektion	BRSV	1	
	PI-3	0	
	BCV	2	
	BAV-1	1	6
	BAV-4	2	
	BVDV	0	
Zweifach- infektion	BRSV+PI-3	1	
	BRSV+BCV	1	
	BRSV+BAV-4	3	8
	PI-3+BAV-1	1	
	BCV+BAV-1	1	
	BAV-1 + BVDV	1	
Dreifach- infektion	BRSV+PI-3+BCV	1	
	PI-3+BCV+BAV-1	1	
	BRSV+BCV+BAV1	1	
	BRSV+BAV-1+BAV-4	1	10

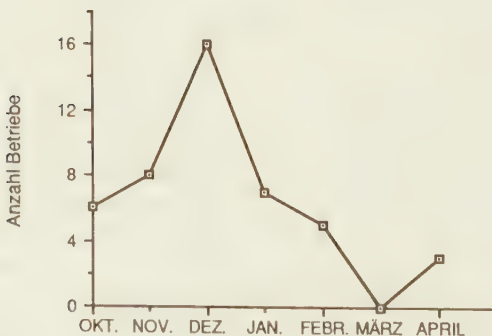
	BRSV+BCV+BAV-4	2	
	BCV+BAV-1+BVDV	2	
	BRSV+BAV-4+BVDV	1	
	BCV+BAV-1+BVDV	1	
	BRSV+BCV+BAV1+BAV-4	3	
	BRSV+PI-3+BCV+BAV-1	1	
Vierfach-	BRSV+PI-3+BAV-1+BAV-4	1	
infektion	PI-3+BCV+BAV-1+BAV-4	1	
	BRSV+BCV+PI-3+BAV-4	1	12
	BRSV+BAV-1+BAV-4+BVDV	2	
	BRSV+PI-3+BAV-1+BVDV	1	
	BRSV+BCV+BAV-1+BVDV	1	
	PI-3+BCV+BAV-1+BVDV	1	
Fünffach-	BRSV+PI-3+BCV+BAV-1+BAV-4	3	
infektion	BRSV+BCV+BAV-1+BAV-4+BVDV	2	7
	BRSV+PI-3+BAV-1+BAV-4+BVDV	2	
Sechsfach-	BRSV+PI-3+BCV+BAV-1+BAV-4	0	0
infektion	+BVDV		
Keine		2	2
Infektion			

3.5. DAS AUFTRETEN VON VIRALEN ATEMWEGS- ERKRANKUNGEN BEIM RIND IN DEN WINTERMONATEN 1986/1987

3.5.1. HÄUFIGKEIT DER MELDUNG VON FÄLLEN RESPIRATORISCHER ERKRANKUNGEN IN DEN BETRIEBEN WÄHREND DER MONATE OKTOBER 86 BIS APRIL 87

Wie schon früher berichtet, treten virusbedingte Atemwegserkrankungen beim Rind normalerweise im Oktober oder November mit Beginn der kalten Witterung auf und lassen sich je nach Witterungsverlauf spätestens bis im April beobachten. Das hat sich auch bei der Untersuchung im Winter 86/87 bestätigt. Wie Abb. 6 zeigt, war im Dezember 1986 ein eindeutiges Maximum von Probeentnahmen in 16 Betrieben zu verzeichnen. Dafür erfolgte im Monat März 1987 keine Meldung von Fällen, was auf die damals herrschende milde Witterung zurückgeführt werden könnte.

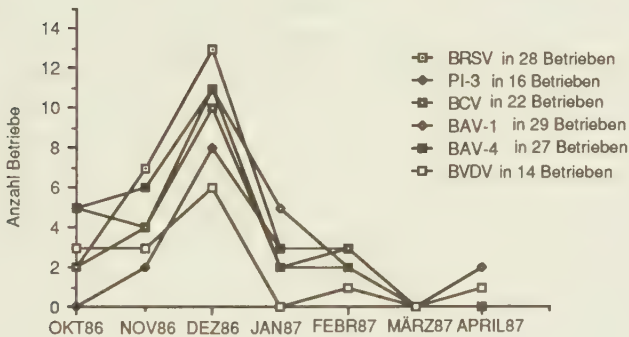
Abb. 6: Häufigkeit der Meldungen von Fällen respiratorischer Erkrankungen in den Betrieben während des Winters 1986/1987.



3.5.2. HÄUFUNG VON VIRUSINFEKTIONEN IN DEN MONATEN OKTOBER 86 BIS APRIL 87

Wie Abb. 7 zeigt, trat in keinem Monat eine Virusinfektion bei den kranken Tieren bevorzugt auf. Wie bei der Meldung der Fälle ergab sich sinngemäss auch beim Nachweis von Virusinfektionen ein Maximum im Monat Dezember. Mehrfachinfektionen traten in einem bestimmten Monat ebenfalls nicht gehäuft auf.

Abb. 7: Nachweis von BRSV-, PI-3-, BCV-, BAV-1-, BAV-4- und BVDV-Infektionen in den Monaten Oktober 1986 bis April 1987



3.6. BETRIEBE, IN DENEN BEI DEN ERKRANKTEN TIEREN KEINE VIRUSINFEKTION NACHZUWEISEN WAR

Trotz des relativ breiten Spektrums an untersuchten Virusinfektionen, waren bei 9 Tieren und in 2 Betrieben überhaupt keine Virusinfektionen nachweisbar.

3.7. GEIMPFTE BETRIEBE

Wie in Kapitel 2.2. erwähnt, hatten 3 der 45 vom BRDC betroffenen Betriebe vor der Mastperiode 86/87 eine Impfprophylaxe durchgeführt.

Im ersten Betrieb wurde mit Bovigrip[®] (inakt.) gegen PI-3, BAV-1 und -3, Reo 1 und 3 geimpft. In diesem Bestand konnten Infektionen mit BRSV und BAV-1 nachgewiesen werden. Der zweite Betrieb setzte Immuresp[®] (mlv) immunprophylaktisch gegen eine PI-3-Infektion ein. Es liess sich im Verlaufe des Winters eine BAV-1/BAV-4-Doppelinfektion bei erkrankten Tieren dieses Bestandes feststellen. Der dritte Betrieb versuchte mit Pneumovac Plus[®] (inakt.) einen Immunschutz gegen PI-3, BAV-3, Reo 3 und MD/VD zu erreichen. Es gelang später, eine Mehrfachinfektion mit BRSV, BCoV, BAV-1 und BAV-4 nachzuweisen.

4. DISKUSSION

4.1. VOR- UND NACHTEILE DER ANGEWANDTEN TESTMETHODEN

4.1.1. IIF UND ELISA: VOR- UND NACHTEILE

Der 1986 eingeführte Antigennachweis mittels Immunfluoreszenz ist eine etablierte Methode, um virale Respirationstraktinfektionen nachzuweisen (2,21,22,23,24). Das Verfahren hat einige Vorteile. So ist die einmalige Probeentnahme für den Praktiker problemlos. Die Untersuchung im Labor dauert maximal 4 Stunden, so dass der Tierarzt rasch informiert ist und entsprechend therapeutisch vorgehen kann. Als Nachweismethode ist die Immunfluoreszenz empfindlich, wenn in den Nasentupferproben genügend Zellen vorhanden sind. Der Antigennachweis mittels Immunfluoreszenz hat aber auch seine Nachteile. Zu diesen gehört der kritische Entnahmezeitpunkt. Die Probe darf nicht in einer zu späten Krankheitsphase entnommen werden, wenn die Virusvermehrung in den Zellen des Respirationstraktes schon abgeschlossen ist. Es ist deshalb vorteilhaft, im betreffenden Bestand Proben der links und rechts vom Patienten stehenden Tiere zu entnehmen. Damit erhöht sich die Chance des Virusantigennachweises. Ein weiterer Nachteil ist darin zu sehen, dass die Probe innert Stunden gekühlt ins Labor zu transportieren ist, damit die antigenhaltigen Zellen intakt bleiben. Nach der Aufarbeitung sind die Proben individuell durch eine erfahrene Kraft zu beurteilen, das heisst, dass eine Automatisierung nicht möglich ist und eine Fluoreszenzeinrichtung Voraussetzung bleibt.

Der Antikörpernachweis mittels ELISA ist ebenfalls etabliert und kann automatisiert werden (49). Die Ablesung erfolgt objektiv und die Untersuchung kann innert einem Tag nach Erhalt des Serums abgeschlossen werden. Jedoch hat auch dieses Verfahren Nachteile. Bei den hohen Durchseuchungsraten in der Rinderpopulation (3.1.3.) kann mit einer einmaligen Blutentnahme die aetiologische Beteiligung eines Virus an einer Respirationstrakterkrankung nicht nachgewiesen werden. Deshalb ist ein Serokonversionsnachweis mittels gepaarten Blutproben, welche im Abstand von mindestens 8 Tagen entnommen

wurden, zwingend. Dies bedeutet für den Tierbesitzer, dass zwei Tierarztbesuche nötig sind, und dass das Resultat erst vorliegt, wenn die Therapie schon abgeschlossen sein sollte.

4.1.2. ÜBEREINSTIMMUNG DER ERGEBNISSE DER ZWEI NACHWEIS-VERFAHREN (Antigennachweis, respektive Nachweis des Antikörpertiteranstiegs)

Es fällt auf, dass die Übereinstimmung beim Vergleich beider Verfahren nicht allzu hoch ist, nämlich nur in etwa 2/3 der untersuchten Fälle, wenn man sowohl die Diagnose am Einzeltier (63% bis 86%) als auch diejenige im Bestand (51% bis 80%) berücksichtigt. Dies ist aber diagnostisch weiter nicht beunruhigend ; denn das Untersuchungsgut umfasste auch Tiere (Durchschnittsalter 4-6 Monate) bei denen noch maternale Antikörper erwartet werden können (6,7,25,28,51). Solche Antikörper können wohl die Ausbildung einer adäquaten humoralen Immunantwort, nicht aber eine Reinfektion des Respirationstraktes mit einer hohen Infektionsdosis verhindern (6,25,36,54).

Es finden sich aber auch ältere Patienten, bei denen nur Virusantigen nachzuweisen war und bei denen im Akutserum ein vorbestehender Antikörpertiter festzustellen war. Diese Antikörper könnten von einer früher durchgemachten Infektion stammen. Es ist durchaus möglich, dass solche Tiere das im Bestande zirkulierende Virus trotzdem in den Nasenepithelien beherbergen und als symptomlose Virusausscheider fungieren (6,7). Auch Mehrfachinfektionen sind bei diesen Tieren möglich. Wenn bei einem Antikörpertiteranstieg jedoch kein Virusantigen festzustellen war, handelte es sich mit grosser Wahrscheinlichkeit um Tiere, bei denen die Nasentupferprobe zu spät, das heisst nach der Virusausscheidungsphase, entnommen wurde. Weiter wäre denkbar, dass das Virusantigen während dem Transport ins Labor die Immunreaktivität verlor.

4.2. DISKUSSION DER RESULTATE

4.2.1. DER NACHWEIS VON VIRUSINFEKTIONEN BEI TIEREN MIT ATEMTRAKTERKRANKUNGEN

4.2.1.1. Infektion mit dem bovinen respiratorischen Synzytialvirus (BRSV).

Als Erreger von Respirationstraktinfektionen beim Rind spielt das BRSV in der Schweiz eine wichtige Rolle und es liessen sich mit den vorliegenden Resultaten Ergebnisse früherer Untersuchungen bestätigen (17,18,19,32). Bei einer Durchseuchungsrate von annähernd 80% war wie im Winter 85/86 bei der Hälfte der untersuchten, erkrankten Einzeltiere und in 2/3 der Betriebe eine BRSV-Infektion nachweisbar. Trotz der hohen Durchseuchungsrate in der schweizerischen Rinderpopulation genügt der Immunstatus der Tiere anscheinend nicht, um die Persistenz des Virus in der Population zu unterdrücken. Ein Grund dafür ist sicher der rege Tierverkehr. Es wird auch diskutiert, dass klinisch gesunde Virusträger und Virusausscheider existieren, die dafür verantwortlich sind, dass das BRSV in Beständen bestimmter Grösse zirkulieren kann (6,7,). Betroffen sind vor allem Tiere im Alter von 4-5 Monaten, die trotz kolostralem oder impfbedingtem Immunschutz, keine lokale Schleimhautabwehr aufbauen konnten. Noch weiterer Abklärung bedürfte eine eventuelle Typenvariabilität des BRSV analog zum humanen RSV (HRSV) (43). Serologisch konnte nämlich mittels monoklonaler Antikörper beim HRSV eine Unterscheidung in 2 Subgruppen, A und B, vorgenommen werden. Diese 2 Subgruppen scheinen keine Kreuzimmunität zu induzieren, da Antikörper gegen Subgruppe A keinen Schutz vor einer Infektion mit einem Subgruppe-B-Virus gewähren und umgekehrt.

4.2.1.2. Infektion mit dem Parainfluenzavirus Typ 3 (PI-3)

PI-3 Infektionen konnten bei 1/5 der erkrankten Tiere und in 1/3 der Betriebe beobachtet werden. Nur bei einem kranken Tier liess sich PI-3 als Monoinfektion nachweisen. Die Bedeutung, die dem PI-3-Virus als Erreger beim BRDC zukommt, ist im Vergleich zu den anderen Virusinfektionen relativ gering. Die

Prävalenz der Antikörper gegen das PI-3 war jedoch mit 88% gross. Das Virus ist in der Rinderpopulation präsent, verursacht jedoch wahrscheinlich eine stumme Feiung. In der Literatur wird dem Virus eine Wegbereiterfunktion für bakterielle Infektionen, insbesondere für Pasteurellen zugeschrieben (7,35,38,40). Ob PI-3 anderen Viren als Wegbereiter dienen kann (18), bleibt wegen der wenig überzeugenden Wirkung von Impfungen gegen PI-3 fraglich (35,40,59).

4.2.1.3. Infektion mit dem bovinen Coronavirus (BCV)

Auch die Antikörper gegen dieses Virus weisen in der Schweiz eine Prävalenz von 90% auf (5). Es wurde früher angenommen, dass es sich dabei ausschliesslich um enterale Infektionen handelt. Heute weiss man jedoch, dass das Virus auch beim Rind pneumotrop sein kann (41,42,55) in Analogie zu den feline, porcine, aviäre und humane Coronaviren. Bei einem Drittel der Einzeltiere und in fast der Hälfte der Betriebe konnte eine BCV-Infektion des Respirationstraktes festgestellt werden. Diesem Virus gebührt im Rahmen des BRDC in Zukunft mehr Beachtung.

4.2.1.4. Infektionen mit den bovinen Adenoviren Typ 1 und Typ 4 (BAV-1, BAV-4)

Es ist bekannt, dass bovine Adenoviren in der Rinderpopulation weit verbreitet (12,27,30,39,59) und als Erreger von bovinen Respirationstraktinfektionen auch in der Schweiz von Bedeutung sind (52). BAV-Typen sind auch in Mehrfachvakzinen enthalten, wobei es sich meist um den Typ 3 handelt. Die vorliegenden Untersuchungen haben ergeben, dass BAV-1 als Vertreter der sogenannten "Kidney Group" (Typ 1-3) bei uns die eindeutig wichtigere Rolle spielte, denn die Prävalenz der Antikörper betrug 84%, und bei den Einzeltierinfektionen war BAV-1 in etwa der Hälfte und bei Betriebsinfektionen in etwa 3/4 der Fälle auszumachen. Gegen BAV-4 als Vertreter der "Testicle Group" (Typ 4-8) wiesen nur die Hälfte der Tiere einen schon bestehenden Antikörpertiter bei der ersten Untersuchung auf. Nur bei 1/4 der Einzeltiere und in etwa 2/3 der Betriebe war eine BAV-4-Infektion nachweisbar. In Österreich

fanden Böckmann und Bürki BAV-4-Infektionen vorherrschend (12) und in anderen Arbeiten wird das Hauptgewicht oft auf Typ 3 gelegt (27,30,37), leider ohne dass Typ 4 oder ein anderer Vertreter der 2. Subgruppe in die Untersuchung miteinbezogen wurde. Eine serologische Kreuzreaktion zwischen den beiden Subgruppen, die von einigen Autoren beschrieben wird (56), konnte mit unseren Antigen- und Antikörperrnachweismethoden nicht festgestellt werden.

4.2.1.5. Infektion mit dem Virus der bovinen Virusdiarrhoe (BVDV)

Bei 1/5 der 110 untersuchten Tiere und in 1/4 der 40 Betriebe war eine BVDV-Infektion mittels Serokonversion nachzuweisen. Ein Hinweis darauf, dass dieses Virus aetiologisch am BRDC beteiligt ist. Ein Miteinbezug von BVDV in impfprophylaktische Massnahmen wäre zu begrüssen, wobei aber auf die Art des Impfstoffes geachtet werden muss. Die Anwendung von "Lebend"impfstoffen ist nicht unproblematisch, nicht nur bei trächtigen sondern auch bei klinisch gesund erscheinenden persistent infizierten Tieren (31, 45).

4.2.2. ABFALL DES ANTIKÖRPERTITERS

Bei einer kleinen Zahl von Tieren konnte anlässlich der ersten Untersuchung ein mindestens 4-facher Titerabfall beobachtet werden (s. 3.1.3). Entweder handelte es sich dabei um einen Titerabfall maternaler Antikörper, oder die Antikörper stammten von einer vorher durchgemachten Infektion mit dem betreffenden Virus, dem in einem solchen Fall eine "Wegbereiter"-Funktion zugeschrieben werden kann; denn die Antikörperbildung erreicht nach 1-3 Wochen ihren Höhepunkt und fällt dann relativ rasch auf ein niedrigeres Niveau ab (37). Aus diesem Grunde besteht die Möglichkeit, dass bei einem Titerabfall eine akute Infektion zeitlich nicht weit zurückliegt.

4.2.3. FÄLLE, BEI DENEN KEINE VIRUSINFEKTION NACHWEISBAR WAR

Bei 9 Tieren (1/10 der untersuchten Rinder) und in 2 Betrieben war bei Infektionen des Respirationstraktes keine Virusinfektion nachweisbar. Die Frage bleibt offen, ob dabei andere Viren wie Reoviren oder Rhinoviren am Krankheitsgeschehen aetiologisch beteiligt waren. Wenn man in Betracht zieht, dass der BRDC eine klassische multifaktorielle Erkrankung ist, spielten in diesen Fällen wahrscheinlich nicht-infektiöse Umweltfaktoren wie Stress, Crowding, Stallklima etc. und nicht-virale Erreger wie Pasteurellen, Mykoplasmen oder Chlamydien eine Rolle (siehe Kap. 4.2). Es wäre deshalb angebracht, neben der virologischen zusätzlich eine bakteriologische Abklärung durchzuführen. Unsere Arbeit zeigt, dass mit der Untersuchung auf die ausgewählten sechs Erreger doch in 9/10 der Fälle eine aetiologische Diagnose zu stellen war, obschon im einzelnen Fall nicht abzuklären war, ob es sich um eine primäre Haupt- oder eine wegbereitende Infektion handelte.

4.2.4. VERGLEICH DER DIAGNOSTIK AM EINZELTIER MIT DER BESTANDESDIAGNOSTIK

Die Infektionsnachweisrate war in der Bestandesdiagnostik tendenziell etwas höher als bei der Diagnostik am Einzeltier. Wenn mehrere Tiere (im Durchschnitt 3) in einem Betrieb untersucht werden, ist die Chance grösser, ein Virus als Erreger einer Respirationstraktinfektion zu erfassen. Da Massnahmen sowieso für den ganzen Betrieb zu treffen sind, ist es sinnvoll, sich auf die Bestandesdiagnostik zu konzentrieren.

4.3. ANDERE ERREGER, DIE AETIOLOGISCH BEIM BRDC IN FRAGE KOMMEN

4.3.1. VIREN

Als Erreger des BRDC kommen auch Reoviren und Rhinoviren in Frage (8,29,38,59). In der Schweiz liegen bezüglich dieser Virusgruppen keine Untersuchungen vor.

4.3.2. BAKTERIEN

Bakterielle Sekundärinfektionen sind als Komplikation von Respirationstrakterkrankungen gefürchtet. Die Liste von Bakterien, welche das virusgeschädigte Respirationstraktepithel zu besiedeln vermögen, ist gross (1,53).

Am häufigsten sind jedoch Pasteurellen (*P. hämolytica* und *P. multocida*) vertreten (1,40,47,52,58), welche auch die bei der Pathogenese wichtigen Exotoxine zu produzieren vermögen. Auch *Hämophilus somnus* könnte beim BRDC eine Rolle spielen (1,16).

4.4. THERAPIE, PROPHYLAXE UND IMPFUNGEN

4.4.1. THERAPIE

Die Humanmedizin kennt zwar gewisse antivirale Medikamente, wie das Ribavirin, die sich aber der Applikationsart und der Kosten wegen nicht für die Veterinärmedizin eignen. Der Praktiker wird also mit Antibiotika und Chemotherapeutika gegen Bakterien und Mykoplasmen vorgehen, um vor allem Sekundärinfektionen vorzubeugen.

Dies geschieht entweder in Form einer Einzeltierbehandlung oder dann rationeller über Futter- oder Trinkwassermedikation. Für den einzelnen Tierhalter bedeutet dies einen grossen Kostenaufwand, der aber im Vergleich zum möglichen Gesamtverlust tragbar sein soll (1,33).

4.4.2. PROPHYLAXE

4.4.2.1. Die Verabreichung von Einstellfutter

Der verbreitete Einsatz von Einstellfutter weist auf das Bedürfnis nach einer kostengünstigen Prophylaxe hin. Damit wird aber das Rückstandsproblem im Fleisch nicht gelöst.

4.4.2.2. Immunprophylaxe

Am Beispiel der drei geimpften Bestände (3.7.) wird ersichtlich, dass eine Impfung gegen den BRDC wegen des breiten Erregerspektrums nicht unproblematisch ist. Im schweizerischen Handel sind verschiedene Impfstoffe gegen den BRDC erhältlich, doch vermochten sie sich trotz des grossen Marktpotentials nicht wie erhofft durchzusetzen. Dass mit der Impfung eine Milderung der Symptome und dadurch eine Minderung der Verluste erwartet werden kann, wird von verschiedenen Autoren beschrieben (25,57,60). Doch lassen sich dadurch Erkrankungen nicht verhindern. Die Gründe für ein Versagen der Immunprophylaxe sind vielseitig. So erfolgt die Applikation der Impfstoffe, mit Ausnahme der PI-3-Vakzine, parenteral und nicht lokal (40,58). Weiter können eventuell vorhandene maternale Antikörper (durchschnittlich bis zum 4.-6. Lebensmonat vorhanden) eine Immunantwort blockieren (28). Ein weiteres Problem stellt das grosse Erregerspektrum dar. Eine wirksame, ein breites Erregerspektrum abdeckende Kombinationsvakzine fehlt noch; denn die meisten Vakzinen sind zu einseitig, und gegen das respiratorische BCV existiert unseres Wissens überhaupt noch kein Impfstoff. Ob die kombinierte Schluck-Aerosol-Impfung, die über einen "Gut-Respiratory-link" funktionieren soll, eine Lösung bringt, bleibt abzuwarten (44). Gleiches gilt für die Anwendung von rekombinantem bovinem alpha1 Interferon (3). Nicht zu vergessen sind die schädigenden Umgebungseinflüsse wie Transport, Crowding, Futterumstellung, Stallklima, welche das Tier zusätzlich einem Stress aussetzen, der durch eine Impfung nur partiell zu neutralisieren ist. Die Forderung nach einem wirkungsvollen Bekämpfungsmittel, sei es nun eine Vakzine oder ein Medikament, bleibt angesichts der Bedeutung und Verbreitung der Respirationstrakterkrankungen beim Rind weiter bestehen. Heute dürfte eine auf den betreffenden Betrieb abgestimmte Kombination von Prämedikation, Impfungen und von Immunmodulatoren das Mittel der Wahl sein (4), wobei die Optimierung des Managements nicht ausser Acht zu lassen ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Winter 1986/87 kamen 123 Tiere der Rindergattung im Alter zwischen 1 Woche und 5 Jahren mit Atemwegserkrankungen aus 45 Beständen (19 Mastbetriebe, 26 konventionelle Milchbetriebe) zur Untersuchung auf Virusinfektionen des Respirationstrakts. Die Untersuchung umfasste folgende Viren: Das bovine respiratorische Synzytialvirus (BRSV), das Parainfluenzavirus Typ 3 (PI-3), das bovine Coronavirus (BCV), die bovinen Adenoviren Typ 1 und 4 (BAV1, BAV4) sowie das Virus der bovinen Virusdiarrhoe (BVDV). Zur Bestätigung einer aktuellen Virusinfektion wurden Nasentupferproben für den Virusantigennachweis mittels Immunfluoreszenz und gepaarte Blutproben für den Nachweis eines Antikörpertiteranstiegs entnommen. Die Untersuchung auf BVDV erfolgte bei 110 der 123 Tiere nur serologisch mittels ELISA.

Es ergaben sich Durchseuchungsraten von 77-91% für BRSV, PI-3, BCV und BAV1, hingegen nur von 44% für BAV4. Der Anteil Tiere mit vorbestehendem Titer gegen BVDV betrug 56%.

Eine aktuelle BRSV Infektion war bei 66 Tieren aus 29 Betrieben nachweisbar, eine PI-3 Infektion bei 25 Tieren aus 16 Betrieben, eine BCV Infektion bei 44 Tieren aus 22 Betrieben, eine BAV1 Infektion bei 55 Tieren aus 34 Betrieben, eine BAV4 Infektion bei 33 Tieren aus 27 Betrieben und eine BVDV Infektion bei 21 Tieren aus 14 Betrieben. Dabei zeigten sich häufig Mehrfachinfektionen mit zwei oder mehr Virusarten. Nur bei 9 Tieren aus zwei Beständen gelang der Nachweis einer Virusinfektion nicht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung machen deutlich, dass virale Erreger bei Atemwegserkrankungen des Rindes in unserem Lande eine bedeutende Rolle spielen.

Therapeutische und immunprophylaktische Massnahmen werden zum Schluss kurz diskutiert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Amstutz H.E., Horstman L.A. and Morter R.L.: Clinical evaluation of the efficacy of *Haemophilus somnus* and *Pasteurella* sp. bacterins. *Bovine Pract.*, 16; 106-108, 1981.
2. Anestad G. and Moehle O.R.: Rapid diagnosis of respiratory syncytial (RS) virus infection by immunofluorescence: A simplified procedure for the preparation of nasopharyngeal suction specimens. *Acta path. microbiol. scand. Sect. B*, 89; 285-287, 1981.
3. Babiuk L.A., Lawman M.J.P. and Gifford G.A.: Use of recombinant bovine alpha1 interferon in reducing respiratory disease induced by bovine herpesvirus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31; 752-757, 1987.
4. Baljer G.: Infektionsprophylaxe in der Kälbermast. *Tierärztl. Umschau*, 43; 17-22, 1988.
5. Battaglia M., Lutz H. und Wyler R.: Serologische Uebersichtsuntersuchung über die Verbreitung des bovinen Coronavirus in der Schweiz. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 128; 213-218, 1986.
6. Bartha A., Benkó M., Kükedi A. and Vetési F.: Study of prolonged virus infection in cattle stocks infected by bovine respiratory syncytial virus. *Acta Vet. Hung.*, 34; 271-279, 1986.
7. Bekkum van J.G.: Respiratory disease in the bovine caused by viruses. *Proc. 12th World Congr. Diseases of Cattle*, Amsterdam, 1; 16-20, 1982.
8. Böckmann J. und Bürki F.: Serologische Bestimmungen über die Häufigkeit respiratorisch-pathogener Virusarten unter österreichischen Schlachtkälbern. *Wien. tierärztl. Mschr.*, 63; 117-120, 1976.
9. Bögel K.: Bovine rhinoviruses. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 152; 780-785, 1968.

10. Bolin S.R., McClurkin A.W., Cutlip R.C. and Coria M.F.: Response of cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus to vaccination for bovine viral diarrhea and to subsequent challenge exposure with cytopathic bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.*, 46; 2467-2470, 1985.
11. Brugère-Picoux J. und Cotterau P.: Das bovine respiratorische Synzytialvirus BRSV - mikrobiologische und klinische Aspekte. *Tierärztl. Umschau*, 42; 440-448, 1987.
12. Brownlie J., Clarke M.C., Howard C.J. and Pocock D.H.: The development of disease following infection of cattle with non-cytopathic and cytopathic bovine virus diarrhoea virus. 9th Int. Symposium, Perugia, Infections of the reproductive system of some domestic animal species; 35-38, 1986.
13. Cho H.J. and Jericho K.W.F.: Induction of immunity against pneumonic pasteurellosis following experimental infection in calves. *Can. J. Vet. Res.*, 50; 27-31, 1986.
14. Crouch C.F., Raybould T.J.G. and Acres S.D.: Monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine enteric coronavirus. *J. Clin. Microbiol.*, 19; 388-393, 1984.
15. Cutlip R.C., McClurkin A.W. and Coria M.F.: Lesions in clinically healthy cattle persistently infected with the virus of bovine viral diarrhea - glomerulonephritis and encephalitis. *Am. J. Vet. Res.*, 41; 1938-1941, 1980.
16. Espinasse J.: Vorbeuge und Behandlung von respiratorischen Erkrankungen beim jungen Rind. *Dtsch. tierärztl. Wschr.*, 94; 240-247, 1987.
17. Florent G., Marneffe de C. und Boller E.: Bovines respiratorisches Synzytialvirus (BRSV) in der Schweiz. Eine serologische Studie, *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 127; 661-663, 1985.

18. Gabathuler K.: Respiratorisches Synzytialvirus in der Rinderpraxis. Schweiz. Arch. Tierheilk., 125; 149-153, 1983.
19. Gabathuler R.: Infektiöse Atemwegserkrankungen beim Rind im Winter 1985/86 : Nachweis von Infektionen mit dem bovinen respiratorischen Synzytial- und dem Parainfluenzavirus Typ 3 mittels Immunfluoreszenz in Nasentupferproben sowie mittels Antikörper-Titeranstieg im Serum (ELISA). Diss. Vet. Med. Fakultät, Universität Zürich, 1986.
20. Gabathuler R., Boller H., Gabathuler K., Hess R.O., Kocherhans R. und Wyler R.: Infektiöse Atemwegserkrankungen beim Rind im Winter 1985/86 : Nachweis von Infektionen mit dem bovinen respiratorischen Synzytial- und dem Parainfluenzavirus Typ 3 mittels Immunfluoreszenz in Nasentupferproben sowie Antikörper-Titeranstieg im Serum (ELISA). Schweiz. Arch. Tierheilk., 129; 457-471, 1987.
21. Gardner P.S., McGuckin R. and McQuillin J.: Adenovirus demonstrated by immunofluorescence. Brit. Med. J., 3; 175, 1972.
22. Gardner P.S. and McQuillin J.: Rapid virus diagnostic - application of immunofluorescence, 2nd Ed. Butterworths, 1980.
23. Gardner P.S. and McQuillin J.: Application of immunofluorescent antibody technique in rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infection. Brit. Med. J., 3; 340-343, 1968.
24. Gardner P.S., McQuillin J. and McGuckin R.: The late detection of respiratory syncytial virus in cells of respiratory tract by immunofluorescence. J. Hyg. Camb., 68; 575-580, 1970.
25. Holzhauer C.: Prevention of Pinkengriep by vaccination, a field trial. Proc. 2th World Congr. Diseases of Cattle, Amsterdam 1; 166-170, 1982.

26. Howard C.J., Stott E.J., Thomas L.H., Gourlay R.N. and Taylor G.: Protection against respiratory disease in calves induced by vaccines containing respiratory syncytial virus, parainfluenza type 3 virus, *Mycoplasma bovis* and *M. dispar.* *Vet. Rec.*, 121; 372-376, 1987.
27. Key D.W. and Derbyshire J.B.: Serological studies of parainfluenza type 3 virus, bovine adenovirus type 3 and bovine respiratory syncytial virus infection in beef calves. *Vet. Microbiol.*, 9; 587-592, 1984.
28. Kimman T.G., Westenbrink F., Schreuder B.E.C. and Straver P.J.: Local and systemic antibody response to bovine respiratory syncytial virus infection and reinfection in calves with and without maternal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, 25; 1097-1106, 1987.
29. Lamont P.H.: Reoviruses. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 152; 807-813, 1968.
30. Lehmkuhl H.D., Smith M.H. and Gough P.M.: Neutralizing antibody to bovine adenovirus serotype 3 in healthy cattle and cattle with respiratory tract disease. *Am. J. Vet. Res.*, 40; 580-583, 1979.
31. Liess B., Frey H.-R., Orban S. und Hafez S.M.: Bovine virusdiarrhoe (BVD) - "Mucosal disease": Persistente BVD-Feldvirusinfektionen bei serologisch selektierten Rindern. *Dtsch. tierärztl. Wschr.*, 90; 249-296, 1983.
32. Linggi T. und Wyler R.: Das bovine respiratorische Synzytialvirus als Erreger von Respirationstrakterkrankungen des Rindes: Eine klinische und seroepidemiologische Untersuchung in der Schweiz. *Schweiz. Arch. für Tierheilk.*, 127, 651-659, 1985.
33. Mahin L., Wellemans G. and Shimi A.: Prevalence of antibodies to bovid herpesvirus 1 (IBR-IPV), bovine virus diarrhoea, bovine respiratory syncytial, parainfluenza 3, adeno A and adeno B viruses in indigenous and imported moroccan cattle. *Ann. Rech. Vét.*, 16; 279-283, 1985.

34. Martin S.W.: Vaccine prophylaxis of bovine respiratory disease. *Can. Vet. J.*, 25; 44-48, 1984.
35. Martin S.W. and Bohac J.G.: The association between serological titers in infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine virus diarrhea virus, parainfluenza-3 virus, respiratory syncytial virus and treatment for respiratory disease in Ontario feedlot calves. *Can. J. Vet. Res.*, 50; 351-358, 1986.
36. Mattson D.E.: Adenovirus infection in cattle. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 163; 894-896, 1973.
37. Mayr A., Bachmann P.A., Bibrack B. und Wittmann G.: Virologische Arbeitsmethoden. Band 1 und 2, p. 83, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1974.
38. Mohanty S.B.: Bovine respiratory viruses. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 22; 83-109, 1978.
39. Mohanty S.B.: Comparative study of bovine adenoviruses. *Am J. Vet. Res.*, 32; 1899-1905, 1971.
40. Mohanty S.B.: Vaccination programs against infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza-3, and pasteurallae. *Proc. 12th World Congr. Diseases of cattle, Amsterdam* 1; 139-145, 1982.
41. Möstl K. und Bürki F.: Ursächliche Beteiligung boviner Coronaviren an respiratorischen Krankheitsausbrüchen bei Kälbern und pathogenetisch-immunologische Ueberlegungen hierzu. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 195; 19-22, 1988.
42. McNulty M.S., Bryson D.G., Allan G.M. and Logan E.F.: Coronavirus infection of the bovine respiratory tract. *Vet. Microbiol.*, 9; 425-434, 1984.

43. Mufson M., Belshe R.B., Oervell C. and Norrby E.: Subgroup characteristics of respiratory syncytial virus strains recovered from children with two consecutive infections. *J. Clin. Microbiol.*, 25; 1535-1539, 1987.
44. Nedrud J.G., Liang X., Hague N. and Lamm M.E.: Combined oral/nasal immunization protects mice from sendai virus infection. *J. Immunol.*, 139; 3484-3492, 1987.
45. Perdritz J.A., Rebhun W.C., Dubovi E.J. and Donis R.O.: Bovine virus diarrhea - Clinical syndromes in dairy herds. *Cornell Vet.*, 77; 46-74, 1987.
46. Paccaud M.F. and Jacquier C.: A respiratory syncytial virus of bovine origin. *Arch. ges. Virusforschg.*, 30; 327-342, 1970.
47. Peters A.R.: Vaccines for respiratory disease in cattle. A short communication. *Vaccine*, 5; 164, 1987.
48. Prince G.A., Hemming V.G., Horswood R.L., Baron P.A. and Chanock R.M.: Effectiveness of topically administered neutralizing antibodies in experimental immunotherapy of respiratory syncytial virus infection in cotton rats. *J. Virol.*, 61; 1851-1854, 1987.
49. Smithyman A.M., Kampfner G.L., Platt J.H. and Layton G.T.: A computerised micro-ELISA system for the analysis of in vivo and in vitro antibody production. In: *Current topics in vet. med. animal Sci.*, 22, Wardley R.C. and Crowther J.R. editors.
50. Storz J.: Psittacosis-lymphogranuloma agents in bovine pneumonia. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 152; 814-821, 1968.
51. Stott E.J., Thomas L.H., Collins A.P., Crouch S., Jebbett J., Smith G.S., Luther P.D. and Caswell R.: A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease. *J. Hyg. Camb.*, 85; 257-270, 1980.

52. Schipper E., Nicolet J., König H. und Steck F.: Virusbedingte Respirationskrankheiten in Kälber- und Rindermastbetrieben. Schweiz. Arch. Tierheilk., 114; 334-360, 1972.
53. Scholz H., Amtsberg G., Westermilies U., Binder A., und Kirchhoff H.: Untersuchungen zur Bronchopneumonie des Rindes: 1. Versuchsanstellung und mikrobieller Status von Nasen- und Tracheobronchialsekret. Tierärztl. Umschau, 42; 272-280, 1987.
54. Terpstra C., Eikelenboom, J.L. and Glas C.: Experiences with early vaccination of fattening calves against infectious bovine rhinotracheitis, bovine virus diarrhoea and parainfluenza type 3. Proc. 12th World Congr. Disease of Cattle, Amsterdam 1; 179-181, 1982.
55. Thomas L.H., Gourlay R.N., Stott E.J., Howard C.J. and Bridger J.C.: A search for new microorganisms in calf pneumonia by the inoculation of gnotobiotic calves. Res. Vet. Sci., 33; 170-182, 1982.
56. Weber P.: Einsatz der Immunfluoreszenz bei virologischen Forschungs- und Diagnostikfragen. Diss. Vet. Med. Fakultät, Universität Wien, 1976.
57. Wellemans G.: Evaluation du programme de vaccination anti-virus respiratoire syncytial bovin en Belgique. Proc. 12th World Congr. Diseases of Cattle, Amsterdam, 1; 146-152, 1982.
58. Wilkie B.N.: Is immunization against bovine respiratory disease possible? Can. Vet. J., 25; 48-50, 1984.
59. Wizigman G.: Untersuchung über Epidemiologie und Ätiologie der Rinder Grippe. 21; Zbl. Vet. Med., 563-579, 1974.

60. Zygraich N.: Vaccination against respiratory syncytial virus: A five years experience with Rispoval[®]. Proc. 12th World Congr. Diseases of Cattle, the Netherlands, pp. 189-195, 1982.

7. VERDANKUNGEN

Allen, die mir während dieser Arbeit geholfen haben, möchte ich herzlich danken, insbesondere:

Herrn Prof. Dr. R. Wyler für die Ueberlassung des Themas und seine stetige Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Dr. U. Braun für die Uebernahme des Korreferates.

Den Herren Prof. E. Peterhans, Bern, für die serologische Untersuchung auf BVDV und Prof. F. Bürki, Wien, für die freundliche und effiziente Einführung in die Adenovirushethodik und für die bovinen Adenovirusstämme.

Den Herren Tierärzten Dr. Karlovic und Dr. Wolperth in Bassersdorf, Dr. Hess in Effretikon, Dr. Prévost in Wald, Dr. Eisenegger in Rüti, Dr. Häfliger in Sins und den Assistenten der Ambulanz des Tierspitals für die Ueberweisung der Fälle.

Den Landwirten für ihren nicht selbstverständlichen Zeitaufwand und ihre Unterstützung.

Herrn R. Kocherhans für das Ueberlassen der BCV-Reagenzien.

Herrn Dr. M. Hofmann, der mir unermüdlich in allen täglichen Laborfragen zur Seite stand.

8. LEBENSLAUF

Christine Läuchli, geboren am 15.3.1959 in Zürich, Bürger von Remigen (AG).

1965-1978	Schulen in Massagno (TI), Therwil (BL), Oberwil (BL)
1978	Maturitätsabschluss im Gymnasium Oberwil (BL)
1979-1985	Aufnahme des veterinärmedizinischen Studiums in Neuchâtel mit Fortsetzung in Zürich
Nov. 1985	Staatsexamen an der Universität Zürich
Jan. 1986-Sept. 86	Assistentin in einer Gross- und Kleintierpraxis im Kanton Bern
Okt. 1986-Febr. 1988	Assistentin am Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich

